

**Recenzja rozprawy doktorskiej autorstwa magister Katarzyny Anny Wójcik pt.
„Czynniki regulujące transformację fibroblastów oskrzelowych w miofibroblasty u
chorych na astmę”.**

Dr hab. med. Krzysztof Kowal

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska „Czynniki regulujące transformację fibroblastów oskrzelowych w miofibroblasty u chorych na astmę” autorstwa magister Katarzyny Anny Wójcik jest przeprowadzonym w warunkach *in vitro* klasycznym badaniem eksperymentalnym w oparciu o unikalny materiał kliniczny. Dotyczy patomechanizmów przebudowy dróg oddechowych u chorych na astmę.

Patologiczna przebudowa dróg oddechowych wraz z trwałym upośledzeniem funkcji płuc jest obecnie największym problemem u chorych na astmę i stanowi w dalszym ciągu największe wyzwanie kliniczne. Nie posiadamy obecnie metod diagnostycznych pozwalających na przewidywanie i wczesne wykrycie chorych na astmę, u których wystąpi trwałe upośledzenie funkcji płuc, natomiast dostępne opcje terapeutyczne wykazują jedynie niewielką skuteczność w prewencji czy leczeniu takich chorych.

Badania mechanizmów prowadzących do trwałej przebudowy dróg oddechowych u chorych na astmę uważam za jak najbardziej uzasadnione zarówno z punktu widzenia poznawczego jak i praktycznego wskazującego przyszłe potencjalnych opcje diagnostyczno-terapeutyczne.

Powyższa praca doktorska jest wynikiem współpracy badawczej prowadzonej w renomowanych ośrodkach naukowych i stanowi kontynuację prowadzonych od wielu lat badań dotyczących patogenezy astmy .

Rozprawa przedstawiona jest na 120 stronach maszynopisu i ma typowy układ. Można w niej wyróżnić następujące części: Streszczenie, Wstęp, Cele badawcze, Materiały i metody, Wyniki, Dyskusję, Wnioski, Bibliografię oraz Załączniki. Praca ilustrowana jest 22 rycinami i zawiera 9 tabel oraz informacje zawarte w rozdziale Dodatki. Obszerna Bibliografia prezentuje 202 pozycje literaturowe, z których znaczna większość opublikowana została w ciągu ostatnich 5 lat.

Doktorantka w jasny sposób przedstawia problem kliniczny oraz dotychczas poznane mechanizmy przebudowy dróg oddechowych. Opierając się o dane literaturowe jak również prace pochodzące z macierzystej uczelni i osiągnięcia własne precyzyjnie określiła cele badawcze. Na podkreślenie zasługuje fakt, iż koncepcja analizy wpływu szlaku Wnt na proces powstawania miofibroblastów powstała w oparciu o doniesienia kliniczne wskazujące na korzystny wpływ leków ingerujących w ten szlak na przebieg astmy.

Zastosowane metody składają się na „klasyczny” eksperyment naukowy przeprowadzony w warunkach in vitro przy użyciu unikalnego materiału klinicznego. Na podkreślenie zasługuje zogniskowane spojrzenie na badane zjawisko przy użyciu różnorodnych technik molekularnych oraz immunologicznych. Ocena ekspresji poszczególnych genów na poziomie zarówno RNA jak i białka oraz metody interwencji wyciszenia genu nie tylko zwiększają wiarygodność eksperymentu ale także odkrywają mechanizmy badanych zjawisk. Podobnie modyfikacja szlaku Wnt została przeprowadzona zarówno poprzez zahamowanie GSK- β 3 jak również zastosowanie zewnątrzkomórkowego liganda, co dodatkowo zwiększa wiarygodność badań.

Liczba zakwalifikowanych chorych pozwala na poprawną ocenę wyników przy użyciu zastosowanych metod statystycznych.

Wyniki przedstawione są w sposób jasny i zrozumiały.

Dyskusja stanowi krytyczne spojrzenie na wyniki badań w świetle danych literaturowych.

Wszystkie fakty w pracy doktorskiej posiadają odniesienia literaturowe. Poparte są również publikacjami pochodzącymi z Ośrodków w których Doktorantka realizowała swoje badania.

Przeprowadzone badania oraz ich krytyczna analiza pozwoliły Doktorantce na sformułowanie wniosków odpowiadających na postawione na początku pracy cele badawcze.

Włączając się w dialog dotyczący interpretacji przedstawionych badań uprzejmie proszę o skomentowanie poniższych uwag w trakcie obrony pracy doktorskiej:

Czy prawidłową jest nazwa „fosfatydyloinozytolo-3-fosforan”, czy „fosforan-3-fosfatydyloinozytolu”?

Strona 25: Wymieniając źródła komórkowe TGF- β przeoczono jedno bardzo istotne, które źródło, które również dostarcza trombospondynę przydatną w aktywacji latentnego TGF- β .

Tabela 1: Przedstawiany na dole tabeli wpływ TGF- β na komórki układu odpornościowego zawiera pozornie sprzeczne informacje (wpływ zarówno zwiększający jak i hamujący proliferację limfocytów T i B) dlatego też powinien być uzupełniony komentarzem.

Strona 28 wiersze 9 i 7 od dołu zawierają sprzeczne informacje. Wiersz 9 „CTGF....pośredniczy w wywoływaniu wielu efektów TGF- β ”. Wiersz 7 „CTGF współuczestniczy w wywoływaniu FMT za pośrednictwem TGF- β ”.

Strona 29 wiersz 13 „limfocyty T regulujące” zwykle nazywamy je limfocytami T regulatorowymi.

Metody: Czy kwalifikowani chorzy tolerowali aspirynę? Czy osoby zdrowe lub astmatycy przyjmowali aspirynę lub inne niesterydowe leki przeciwzapalne? Czy znane są

dawki kortykosteroidów wziewnych i doustnych przyjmowanych przez chorych? Czy osoby zakwalifikowane do badania paliły papierosy w okresie wykonywania badań lub poprzednio? Proszę o komentarz dotyczący potencjalnego wpływu zaburzeń produkcji eikozanoidów na badane procesy.

Metody: Czy pożywkę hodowlaną wzbogacano w niezbędne aminokwasy i beta-merkapotoetanol?

Metody izolacji RNA. W jaki sposób minimalizowano wpływ zanieczyszczenia DNA na badania RT-PCR?

Wyniki: Czy stwierdzono różnice w badanych in vitro parametrach w zależności od ciężkości astmy lub intensywności leczenia?

Wyniki: Rycina 15: Jak Doktorantka interpretuje brak różnicy w działaniu TGF- β na ekspresję CTGF na poziomie RNA pomiędzy AS i NA przy istotnie mniejszej produkcji białka CTGF przez fibroblasty NA?

Dyskusja: Nieco dwuznacznie brzmi zdanie na stronie 82: „...w HBFs AS oprócz możliwego mechanizmu powodującego zatrzymanie translokacji białek p-Smad-2 do jądra komórki, mogą istnieć również inne sygnały regulujące ekspresję białek miofibroblastów na poziomie ich transkrypcji.”

Dyskusja: Czy znane są Doktorantce dane dotyczące ekspresji/aktywności receptora TGF- β fibroblastów chorych na astmę?

Przedstawione uwagi bynajmniej nie umniejszają wartości pracy, a wręcz przeciwnie stanowią o jej unikalnym, nowatorskim charakterze, odkrywającym dotychczas nieznane fakty i wnoszącym istotny wkład w poznanie mechanizmów przebudowy dróg oddechowych. Powyższą pracę uważam za wzorcową pokazującą w jaki sposób badania in vitro z zastosowaniem nowoczesnych metod immunologicznych i molekularnych w analizie

dynamicznych zjawisk, którym poddano komórki uzyskane z unikalnego materiału klinicznego może przyczynić się do wytłumaczenia procesów patologicznych zachodzących u chorych na astmę.

Podsumowanie

Przedstawiona mi do recenzji praca spełnia formalne wymagania stawiane rozprawom doktorskim. Uważam, iż magister Katarzyna Anna Wójcik prawidłowo wskazała istotny problem kliniczny oraz postawiła cele badawcze, które zrealizowała stosując model eksperymentalny in vitro oraz szereg nowoczesnych metod laboratoryjnych. Analiza uzyskanych wyników wraz z ich krytyczną oceną pozwoliły Doktorantce na osiągnięcie zamierzonych celów oraz wskazanie potencjalnych dalszych zastosowań uzyskanych wyników. Niniejszym wnioskuję o dopuszczenie powyższej pracy do publicznej obrony i uważam, iż zasługuje ona na wyróżnienie.

Białystok 04.03.2015

Dr hab. med. Krzysztof Kowal